

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-210925

(43)公開日 平成4年(1992)8月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 39/00	G	8413-4 C		
9/00	H	7329-4 C		
9/127	L	7329-4 C		
	T	7329-4 C		
	F	7329-4 C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-26675	(71)出願人	591024591 デュファル インテルナチオナル レセールフ ベスローテン フエンノートシヤツブ
(22)出願日	平成3年(1991)1月29日		DUPHAR INTERNATIONA RESEARCH BESLOTEN V ENNOOTSHAP
(31)優先権主張番号	9000207		オランダ国 ウエースプ セー イエー
(32)優先日	1990年1月29日		ファン ホウテンラーン 36
(33)優先権主張国	オランダ(NL)	(72)発明者	アールゼン デ ハーン オランダ国ウエースプ セー イエー フ アン ホウテンラーン36
		(74)代理人	弁理士 杉村 晓秀 (外5名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 鼻腔内または吸入投与用ワクチン製剤およびその製造方法

(57)【要約】

【目的】 インフルエンザ感染を予防する鼻腔内または吸入投与用のリポソーム含有ワクチン製剤およびそれを製造する。

【構成】 鼻腔内または吸入インフルエンザ サブユニット ワクチン製剤がエンブティ リポソームと自由に混合した抗原材料を含み、リポソームの存在がリポソームを含まないサブユニット ワクチンによる i.m. 免疫感作に関して循環において IgG 応答を刺激すると共に、呼吸路において局部 IgA 応答を発生する。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンブティ リポソームと自由に混合する抗原材料を含む鼻腔内または吸入投与用ワクチン製剤。

【請求項2】 抗原材料としてインフルエンザ ウィルスの表面抗原を含む請求項1記載のワクチン製剤。

【請求項3】 抗原材料が異なる抗原の組換え体からなる請求項1記載のワクチン製剤。

【請求項4】 リポソーム材料対抗原材料の質量比を少なくとも5とした請求項1～3のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項5】 リポソームが実効負表面荷電を与える成分を含む請求項1～4のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項6】 リポソームは1または2種以上のりん脂質、必要に応じてステロールを含む請求項1～5のいずれか一つの項記載のワクチン製剤。

【請求項7】 ホスファチジルコリンをりん脂質として用いた請求項6記載のワクチン製剤。

【請求項8】 コレステロールをステロールとして用いた請求項6記載のワクチン製剤。

【請求項9】 ジセチルホスフェート、ホスファチジン酸またはホスファチジルグリセロールを電荷決定成分として存在させた請求項5記載のワクチン製剤。

【請求項10】 乾燥脂質を水性媒質に分散し、生成するリポソーム含有混合物を抗原含有溶液と混合することを特徴とする請求項1～9のいずれか一つの項記載のワクチン製剤の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【技術分野】 本発明は鼻腔内または吸入投与用のリポソーム含有ワクチン製剤およびその製造に関する。特に、本発明は人のインフルエンザ感染を防止する上記タイプのワクチンに関する。しかしながら、本発明はインフルエンザ ワクチンの適用に制限するものでない。

## 【0002】

【背景技術】 感染患者に対する予防接種は、特別の病原体から誘導した抗原製剤の導入により感染剤 (infectious agent) に対する免疫応答を刺激することによって、予防接種者の感染を予防または少なくとも抑制している。実際に、誘導免疫応答は2成分、すなわち、体液応答（抗体-特異的抗体の生成）および細胞応答（病原体により感染した細胞を除去できる特異的細胞障害性Tリシンパ球の発生）からなる。

【0003】 多くの予防接種手順は不活化および弱毒化全病原体を含有する製剤を投与することを含んでいる。しかしながら、この製剤は通常、著しく免疫原性であっても、望ましくない副作用を有することから、全病原体での予防接種には無視できない欠点がある。この事は、全感染剤の有害な副作用が実質的に乏しいよく規定され

10

30

40

50

たサブユニットまたは合成ワクチンの使用に向ける最近の傾向を説明している。しかしながら、全病原体と比べて、サブユニットまたは合成ワクチンは少なくとも付加補助剤の不存在において、しばしば極めて免疫原性でない。補助剤は抗原と共に投与する物質または材料であり、抗原に対する免疫応答を刺激する。この場合、望ましくない副作用を生じないサブユニットまたは合成抗原に対する免疫応答を高める適当な補助剤についての必要性がある。

【0004】 インフルエンザ ワクチン製剤は長時間にわたって含み、ある場合には、なお不活化または弱毒化全ウィルスを含んでいる。この製剤は注射部位において著しく発熱および反応する無視できない副作用を有している。現今では、予防接種は、通常、サブユニット製剤で行われている。副作用の少ないこのサブユニットワクチンはウィルスの2種の主な表面抗原、すなわち、幾分精製された形態の赤血球凝集素 (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) を含んでいる。もっとも最近のワクチン製剤においては付加補助剤を加えていない。

【0005】 不活化または弱毒化全インフルエンザ ウィルス ワクチンおよびサブユニット ワクチンは通常、単筋肉内 (single intramuscular) (i.m.) 注射によって投与している。いずれかの予防接種手順により達成されたインフルエンザ感染に対する予防は、特に年齢者において比較的に低い。インフルエンザに対する予防接種の比較的に低い効率はウィルスの高い抗原変異性によるものである。しかしながら、この場合、予防接種によるインフルエンザ感染に対する予防はワクチンに対する免疫応答の刺激および変化 (modification) によって改善することができる。

【0006】 インフルエンザの場合、または一般に感染を呼吸路 (respiratory tract) を介して抑制する場合に、改良された予防接種効率についての計画は循環における適当なT細胞-依存 Ig G 応答の発生のみならず、侵される感染ウィルスに対する防衛の第一線として肺および鼻腔における局部免疫応答 (分泌 Ig A) の発生に向ける必要がある。更に、細胞免疫応答 (細胞障害性T-細胞) は、特に感染を抑制するのに大切である。i.m. 注射 (投与の経路) によるインフルエンザワクチンの投与は呼吸径路における局部 Ig A 応答が得られないことが認められている。

## 【0007】

【発明の開示】 本発明は、鼻腔内または吸入インフルエンザ サブユニット ワクチン製剤におけるリポソームの存在が、遊離サブユニット ワクチン (free subunit vaccine) による i.m. 免疫感作に関して循環において Ig G 応答を刺激すると共に、呼吸路において局部 Ig A 応答を発生することを確めた。

【0008】 リポソームは生体膜 (biological membrane) についてのモデルとして、および薬物および他の生

生物学的活性物質についての潜在的キャリヤー系として広範囲にわたって研究されている。リポソームは單一りん脂質またはステロール、例えばコレステロールと組合せたまたは組合せない種々のりん脂質の混合物から出発する種々の手段で作ることができる。方法学の適当な選択によって、単ラメラ、オリゴラメラまたは多ラメラ小胞の比較的に均質な組成物を作ることができ、小胞の直径はある制限内で変えることができる。各タイプのリポソームは1つまたは2つ以上の同心膜により外部媒質から分離した1または2個以上の区分を有しており、各膜は脂質二重層を含んでいる。水溶性物質はこれらの内部区分内に封入することができる。

【0009】リポソームの補助剤作用についての根本原理は知られていない。しかしながら、ワクチン製剤におけるリポソームは抗原キャリヤーの機能に役立つことは広く認められている。それ故、リポソームの補助剤作用は、体におけるリポソームの細網内皮系（R E S）に属する細胞、特に肝臓、脾臓、骨髄および肺におけるマクロファージに属する細胞への自然標的によるものと思われる。マクロファージは抗原提示細胞（A P C's）として免疫応答における主要役割を演することは知られている。最適な抗原提示は、このタイプの免疫応答に臨界的に含まれているヘルパーT細胞が抗原との相互作用によって、またA P C'sの表面において発現した抗原によって活性化しないから、有効T細胞依存体液性免疫応答の発生に重要である。

【0010】リポソームの補助剤活性はリポソームの封入によってワクチン製剤、特にインフルエンザ ワクチン製剤を改良する多くの試みを提起する。例外なく、これらの製剤において、抗原はリポソームの水性内部内に封入することによって、またはリポソームの外面に結合することによってリポソームと物理的に結合する。例えば欧州特許出願第89402344.9号（公開第0356340号）明細書には抗原がリポソームの表面と親和的に結合するワクチン製剤について記載されている。これらの従来のリポソーム ワクチン製剤が、リポソームの抗原-キャリヤー機能が抗原とキャリヤーとのある種の結合を明らかに要求することから、抗原-リポソーム複合体の発生に基づくことは驚くべきことではない。本発明におけるワクチン製剤は抗原とリポソームの結合を含んでいない。これに対して、製剤はリポソームおよび非封入（non-enclosed）抗原材料を含んでいる。かかるワクチンによって、リポソームの不存在における抗原によるより相当に高い免疫応答が得られるることは、極めて驚くべきことである（例1および2）。更に、リポソームによる免疫応答の刺激は、リポソームおよび抗原を時間間隔をおいて別々に投与する場合（例3）に得られることは、また驚くべきことである。この事は、この場合にリポソームの刺激効果が抗原キャリヤーとしてリポソームの推定機能によらないことを暗示している。リボソ

ームおよび抗原が互いに結合することについて注意を払う必要がないことは、本発明による製剤についての大きい利点である。

【0011】上述する既知のリポソーム ワクチン製剤の効率については、通常、動物、一般にマウスに筋肉内、皮下または腹膜内投与後に試験されている。これに対して、本発明におけるワクチン製剤は鼻腔内的にまたは吸入的に投与し、呼吸路において有意な局部 I g A 応答を誘導することができる。1例においては、リポソーム インフルエンザ ワクチン製剤は鼻腔内に投与されている（トルチリン氏ら「薬物キャリヤーとしてのリポソーム（Liposomes as Drug Carriers）」ページ229～230（1988），G. グリコリアデマ氏（編集者），John Wiley& Sons, Ltd）。しかしながら、この特定製剤においては、抗原をリポソームの水性区分内に封入しているのに対して、本発明によるワクチン製剤においては抗原およびリポソームを自由に混合している。トルチリン氏の上記文献に記載されているワクチン製剤は呼吸路におけるI g A生成について試験されていない。

【0012】本発明におけるワクチンの投与の経路は、インフルエンザのような、通常、生命の危険（life-threatening）に直面しない患者に対する予防接種に特に有利である。これらの場合において、しばしば予防接種を便宜さの問題について考察する場合において、筋肉内注射の不便さは予防接種の効果的な実施において極めて障害になる。

【0013】1例として、本発明を主としてインフルエンザ ウィルス サブユニット抗原について説明する。しかしながら、例5および例6は、本発明がインフルエンザワクチン製剤に制限しないことを示している。また、リポソームは他の抗原と、または異なる抗原の混合物と混合することができる。

【0014】リポソームの刺激効果は、リポソーム材料対抗原材料の質量比が少なくとも5である場合に有意であることを確め、最適比は100～1000程度に高めることができる。

【0015】本発明において用いるリポソームは1または2種以上のりん脂質、例えばホスファチジルコリン（P C）、必要に応じてステロール、例えばコレステロールから作るのが好ましい。更に、リポソームには実効負表面荷電を与える成分を含めることが重要であることを確めた。この目的のために適当な成分としては、例えばジセチルホスフェート（D C P）、ホスファチジン酸（P A）またはホスファチジルグリセロール（P G）を挙げることができる。

【0016】本発明のワクチンにおけるリポソームは多ラメラ タイプが好ましい。このリポソームは乾燥脂質混合物をりん酸緩衝溶液（P B S）のような緩衝塩溶液に分散するこによる簡単な手段で作ることができる。必

5

要に応じて、生成したリポソームを、例えばポリカーポネット ユニポーラ フィルター (unipore filter) を介して押出してリポソームの大きさに極めて均質に分布することができる。

## 【0017】

【実施例】次に、本発明のワクチンの調製および使用を例に基づいて説明する。

## 例 1

5匹のマウス (Balb / C) グループを遊離抗原 (free antigen) (グループA) またはエンプティ リポソーム (empty liposomes) と混合した遊離抗原 (グループBおよびC) で鼻腔的に免疫にした (全量 50 u1 を僅かなエーテル麻醉状態で投与した)。抗原としてはインフルエンザ ウィルス菌株X-97 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> タイプの組換え体インフルエンザ菌株) から既知の方法によって作ったインフルエンザ ウィルス サブユニット ワクチンを用いた。リポソームにはコレステロール (Chol) , 卵黄ホスファチジルコリン (PC) および負帯電脂質を含ませた。この試験において、2種の異なる負帯電脂質、すなわち、ジセチルホスフェート (DCP) およびホスファチジルグリセロール (PG) と比べた。免疫感作の投薬はマウス当り 1 u g の抗原 (単純放射拡散分析により定めたサブユニット生成物の赤血球凝集素 (IIA) に基づく) および 1.6 u モルのリポソームりん脂質とし、2回の免疫感作を 0 日および 4 日目に行った。

【0018】グループBおよびCにおいて、2種の異なる組成物のリポソームを用いた：

(B) : Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比)

(C) : Chol / PC / PG = 5 / 4 / 1 (モル比)

血清試料は第1図に示す時間で採取し、抗原-特異的 IgG の力値を既知の酵素結合抗体免疫吸着アッセ (ELISA) で評価した。

【0019】遊離抗原による免疫感作では比較的に低い抗原-特異的血清 IgG 力値を得た (第1図)。ウィルス抗原をいずれかのタイプのエンプティ リポソームと混合することによって、IgG 応答に強い刺激効果を得た。第1図はインフルエンザサブユニット抗原 (グループA) で、およびリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後のマウスにおける抗原-特異的血清 IgG の力値を示している。

## 【0020】

## 例 2

5匹のマウス (Balb / C) グループを例1に記載すると同様にして鼻腔的に免疫にした。肺洗浄液 (lung washings) を第1免疫感作後 33 日目に採取し (5匹のマウスからの PBS における洗浄液をプールし、最終容量 1.0 ml に濃縮した) 、および ELISA によって抗

10

20

30

40

50

6

原-特異的 IgA を評価した。

【0021】有意な IgA 力値をいずれかの組成のエンプティ リポソームと混合した抗体で免疫にしたマウスから誘導した洗浄液について測定した (第2図)。極めて低い力値を遊離抗体で免疫にしたマウスから誘導した洗浄液において測定した。第2図はインフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) およびリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で i.n. 免疫感作後、33日目にマウスから得た肺洗浄液における抗原-特異的局所 IgA 力値を示している。

## 【0022】

## 例 3

5匹のマウス (Balb / C) グループを、DCP 含有リポソームを用いおよび単純 (single) 免疫感作を与えるという条件で、例1に記載するようにして鼻腔的に免疫にした。マウス グループを遊離抗原のみ (グループA) で、またリポソームと混合した抗原 (グループB) で免疫感作するほかに、マウス グループ (C) にはリポソームと抗原とを時間間隔を置いて別々に与え、この場合、最初にリポソームを与え、リポソームの投与後 24 時間して抗原を与えた。肺洗浄液における血清 IgG および IgA をそれぞれ例1および2に記載するように 33 日目に評価した。

【0023】遊離抗原のみの場合では、検出しうる血清 IgG または局所 IgA 応答が誘発しなかった (第3図)。リポソームと混合した抗原の場合では、肺において抗原-特異的血清 IgG および局所 IgA の高い力値を生じた。リポソームおよび抗原を別々に投与した場合でも、同様の結果が得られたことは有意なことである。

第3図は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) または Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比) のリポソームと混合した抗原 (グループBおよびC) で、および最初にリポソームを与え、その後 24 時間して抗原を与え (グループD) で単純 i.n. 免疫感作した後、33日目におけるマウスの抗原-特異的血清 IgG および肺 IgA 力値を示している。

## 【0024】

## 例 4

16匹のマウス (Balb / C) グループを、遊離抗原の 1 回投与 (グループA) で筋肉的に、またリポソームと混合した抗原 (Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1) の 1 回投与 (グループB) または 2 回投与 (グループC) (0 日および 4 日目) で鼻腔的に免疫にした。対照グループ (D) には抗原を与えたなかった。抗原としては投与当り 5 u g HA でインフルエンザ ウィルス菌株 X-83 (菌株 A / Chile, H1N1 の HA を担持する組換え体) から作ったサブユニット ワクチンを用いた。免疫感作後 35 日目に、マウスを感染インフルエンザ A / クリスト (Christ) / 157 / M<sub>3</sub>, M<sub>1</sub>, E<sub>4</sub> で鼻腔的に攻撃した。攻撃後 7 日生き残ったマウスを記録した。

【0025】結果を表Iに示し、リポソーム鼻腔内ワクチン製剤が筋肉的に投与した遊離サブユニットワクチンと少なくとも同等の感染に対する予防効果のあることを示している。2種の製剤による単一免疫感作ではリ\*

\* ポソーム i.n. ワクチンの場合に僅かにより生存率を示し、および0日および4日目における i.n. 製剤による二重免疫感作では 100%の生存率を与えた。

表 I

グループ	生存率 (%)
A	81.3 (13/16)
B	93.8 (15/16)
C	100.0 (16/16)
D	50.0 (8/16) *)

\*) 生存するマウスは7日後ひどく体調が悪くなり、回収する見込がなかった。

## 【0026】

## 例 5

5匹のマウス (Balb / C) グループをはしか抗原で、DCP 含有リポソームだけを用いるという条件で、例 1 20 に記載するように鼻腔内に免疫にした。抗原としては不活性化はしかウイルスを含む製剤を用いた。マウスを遊離抗原のみ (グループA) で、またはリポソームと混合した抗原 (グループB) で免疫にした。肺洗浄液中の血清 IgG および IgA をELISA で評価した。

【0027】遊離抗原のみの場合には有意な血清 IgG 応答を生じたが、しかしながら、応答はワクチンにリポソームを存在することによって実質的に増大した (第4図)。この場合、遊離抗原のみによる免疫感作後、肺における局所 IgA 応答は検知できなかった。リポソームと混合した抗原の場合には、抗原-特異的 IgA の高い力値が生じた。第4図は、はしか抗原 (グループA) で、または Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比) のリポソームと混合した抗原 (グループB および C) で、i.n. 免疫感作した後のマウスの抗原-特異的血清 IgG および肺 IgA 力値を示しており、この場合抗原は0日または4日目に2回投与した。

## 【図面の簡単な説明】

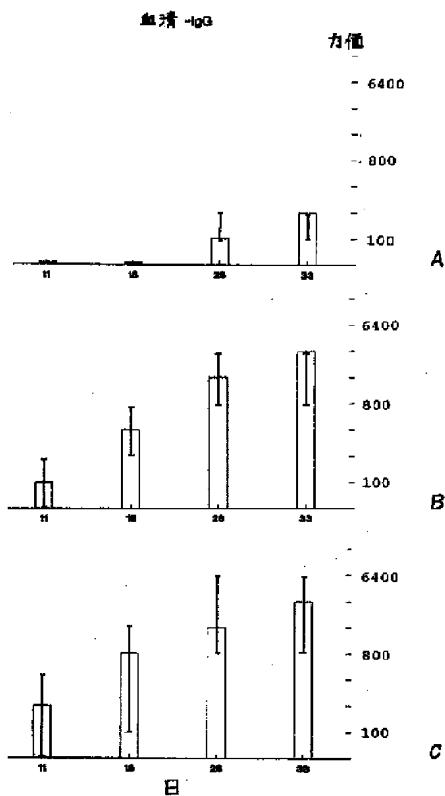
【図1】図1は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) で、およびリポソームと混合した抗原 (グループB およびC) で i.n. 免疫感作後のマウスにおける抗原-特異的血清 IgG 力値を示すグラフである。

【図2】図2は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) およびリポソームと混合した抗原 (グループB およびC) で i.n. 免疫感作後、33日目にマウスから得た肺洗浄液における抗原-特異的局所 IgA 力値を示すグラフである。

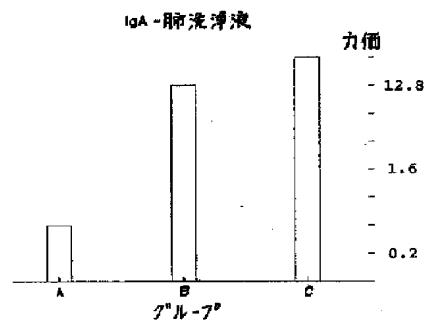
【図3】図3は、インフルエンザ サブユニット抗原 (グループA) または Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比) のリポソームと混合した抗原 (グループB およびC) で、および最初にリポソームを与え、その後24時間して抗原を与え (グループD) で単純 i.n. 免疫感作した後、33日目におけるマウスの抗原-特異的血清 IgG および肺 IgA 力値を示すグラフである。

【図4】図4は、はしか抗原 (グループA) で、または Chol / PC / DCP = 5 / 4 / 1 (モル比) のリポソームと混合した抗原 (グループB およびC) で、i.n. 免疫感作した後のマウスの抗原-特異的血清 IgG および肺 IgA 力値を示すグラフで、抗原は0日または4日目に2回投与した。

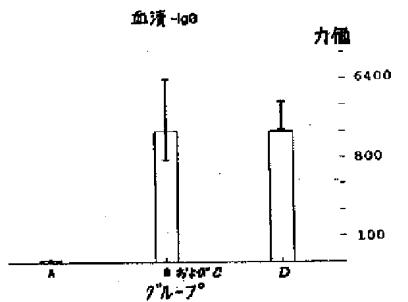
【図1】



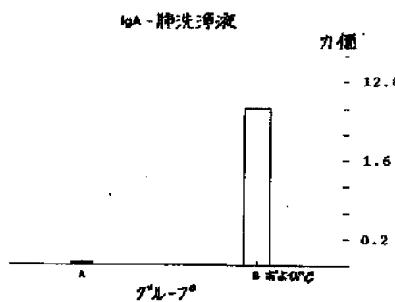
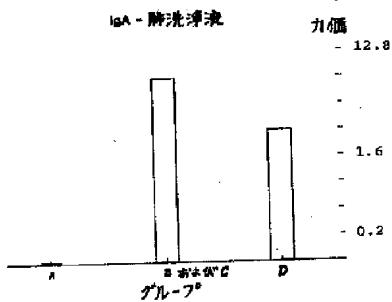
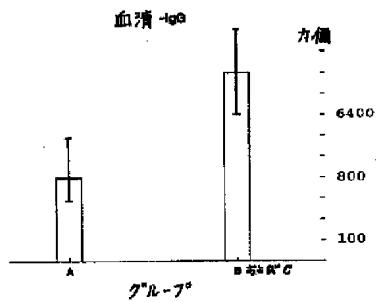
【図2】



【図3】



【図4】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 厅内整理番号 F I 技術表示箇所  
A 6 1 K 39/145 8413-4C  
39/165 8413-4C

(72)発明者 ハルメン ヤコブ ヘールリングス (72)発明者 ヤン クリストヤン ウイルスフト  
オランダ国ウエースプ セー イエー フ  
アン ホウテンラーン36 オランダ国ウエースプ セー イエー フ  
アン ホウテンラーン36